

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack)

Klasifikasi menurut Angiosperm Phylogeny Group (2003), kedudukan pasak bumi adalah sebagai berikut: Kingdom: Plantae, Divisi: Magnoliophyta, Kelas: Magnoliopsida, Subclas: Dilleniidae, Ordo: Sapindales, Family: Simaroubaceae, Genus: *Eurycoma*, Jenis: *Eurycoma longifolia* Jack.

Pasak bumi adalah tumbuhan yang banyak ditemukan di hutan Indonesia dan Malaysia. Tumbuhan ini memiliki beberapa nama lokal antara lain Penawar Pahit, Bedara Pahit, Bedara Puteh, Tongkat Ali, Lempung Pahit, Paying Ali, Tongkat Baginda, Muntah Bumi, Petala Bumi, Akar Jangat Seining, Tungke Ali, Pasak Bumi (Malaysia, Sumatera dan Kalimantan), dan Tung Saw (Thailand) (Susilowati, 2008).

Pasak bumi umumnya berbentuk semak atau pohon kecil yang tingginya jarang mencapai 10 meter, namun ada juga yang tingginya lebih dari 15 meter dan diameter mencapai 15 cm. Daunnya majemuk menyirip, jumlahnya ganjil, panjang 0,3-1 meter dengan anak daun berjumlah 20-30 pasang, berbentuk oblong, bergelombang, warna anak daunnya hijau tua berukuran 5-25 cm, pinggirannya bergelombang, tangkai daunnya berwarna coklat kehitaman. Batang tumbuhan pasak bumi pada umumnya tidak bercabang, tetapi ada juga yang bercabang sedikit menyerupai payung dengan kedudukan daunnya melingkar (*rosette*), batangnya kokoh berwarna coklat keabuan-abuan dan licin. Buah tumbuhan pasak bumi mempunyai ukuran 1,25 cm, berbentuk oblong, ketika masak warnanya menjadi kuning kemudian memerah. Bunganya bersifat dioceus dan monoceous berwarna merah jingga, lebar bunga 0,6 cm, berbulu halus

dengan benjolan kelenjar diujungnya. Akar pasak bumi mempunyai warna coklat muda kekuningan yang tumbuh menembus bumi dengan lurus dan kekar membentuk akar tunggang (Indonesia Botanic Garden, 1998 *cit.* Susilowati, 2008).



Gambar 2.1. Batang pasak bumi

Menurut Padua *et al.*, (1999), menyatakan bunga jantan dan bunga betina pada pasak bumi dapat dibedakan secara mudah berdasarkan ukuran benang sarinya. Bunga betina memiliki benang sari yang besar, sedangkan bunga jantan memiliki putik yang tipis dan kecil. (Hadijah, 2000 *cit.* Susilowati, 2008), Beberapa kasus proses penyerbukan pada pembuahan terjadi pada saat bunga masih belum membuka (penyerbukan tertutup). Letak benang sari yang lebih rendah dari pada kepala putik menyebabkan proses penyerbukan pada tipe ini sulit dilakukan, proses penyerbukan dilakukan hanya terjadi ketika ada vector yang dapat menggerakkan bunga sehingga putik dan benang sari bertemu.

Hussein *et al.*, (2005), menyatakan tumbuhan pasak bumi memiliki tipe benih yang rekalsitran. Persentase perkecambahan pasak bumi sangat rendah di habitat alamnya serta membutuhkan waktu yang cukup lama, hal ini disebabkan karena adanya embrio yang belum cukup masak pada saat pemasakan.



Gambar 2.2 Morfologi benih pasak bumi.

Pasak bumi dapat dijumpai pada tanah asam, berpasir, dan beraerasi baik pada ketinggian di bawah 1.200 meter diatas permukaan laut. Biasanya ditemukan pada hutan primer dan sekunder, tumbuhan ini juga ditemukan pada hutan kerangas dan sub montana (Herianto *et al.*, 2006).



Gambar 2.3. Daun pasak bumi betina.

### 2.1.3 Jenis Pasak Bumi

Ada dua kelompok tumbuhan pasak bumi yaitu *dioceous* dan *monoceous*. Jenis *dioceous* tergolong unik karena terdiri dari pohon jantan dan pohon betina.

- a. Pohon jantan (tidak menghasilkan buah sampai masak/tua). Pohon jantan dapat menghasilkan buah namun gugur pada saat muda. Selain itu memiliki bunga yang dapat tumbuh namun putiknya steril.

- b. Pohon betina (mampu menghasilkan buah). Pohon betina mampu menghasilkan benih dan memiliki benang sari namun steril. Oleh karena itu proses penyerbukannya kemungkinan di bantu oleh serangga dan penyerbukan silang (Susilowati, 2008)

#### **2.1.4 Pemanfaatan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack)**

Tumbuhan pasak bumi telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat tradisional untuk keperluan penyembuhan berbagai penyakit. Berdasarkan kajian farmakologis diperoleh informasi bahwa senyawa canthin pada pasak bumi mampu menghambat pertumbuhan sel kanker, senyawa turunan eurycomanone sebagai anti malaria, senyawa quassinoid berfungsi sebagai anti leukimia, dan prospektif untuk anti Human Immunodeficiency Virus (HIV), serta senyawa etanol yang berfungsi sebagai afrodisiak (Susilawati, 2010).

Kajian etnobotanis telah dilakukan terhadap pasak bumi pada masing-masing bagian tumbuhan. Akar tumbuhan ini dicampur dengan tumbuhan obat lain seperti kayu manis dan digunakan untuk tonik penyehat disabah. Selain itu, di Malaysia kulit akarnya digunakan juga sebagai penawar demam, penyembuh luka-luka digusi atau gangguan cacing serta tonikum setelah melahirkan, sedangkan di kalimantan dan Sabah kulit batang digunakan untuk mengobati nyeri pada tulang. Daun pasak bumi yang muda dan buah pasak bumi digunakan sebagai obat disentri, demikian juga bunga dan buah pasak bumi di Vietnam digunakan sebagai obat disentri (Athimulam, 2006 *cit.* Suhartinah, 2006).

Manfaat pasak bumi bagi ekosistemnya pada vegetasi tiang dan pohon dapat memberikan naungan kepada tumbuhan yang masih berada pada vegetasi semai dan pancang, karena tumbuhan muda memerlukan naungan untuk

mengoptimalkan pertumbuhannya. Bagian tumbuhan pasak bumi seperti daun dan bunga dapat dimanfaatkan oleh vektor seperti burung, serangga, ulat dan lain-lain sebagai bahan makanannya, pasak bumi juga dapat dipergunakan sebagai obat oleh masyarakat disekitar ekosistem tumbuhan tersebut (Susilawati, 2010).

## **2.2 Keragaman Genetik**

Keragaman genetik dalam suatu populasi tanaman sangat penting, dengan maksud untuk mendapatkan karakter-karakter unggul dapat dilakukan. Makin tinggi keragaman genetik maka peluang untuk mendapatkan genotipe unggul semakin besar dan menunjukkan besarnya pengaruh genetik terhadap sifat yang diekspresikan (Knight, 1979). Keragaman tanaman ada yang bisa diwariskan yang disebut keragaman genetik, tetapi ada yang disebabkan oleh faktor lingkungan sehingga tidak dapat diwariskan. Variasi genetik merupakan hal yang sangat penting terhadap kelangsungan hidup populasi dan keberadaannya merupakan suatu karakteristik umum dari sebagian besar jenis tumbuhan (Karsinah, 1999).

Variasi genetik dalam sebuah populasi organisme terutama dihasilkan oleh tiga mekanisme yaitu mutasi, perpasangan alel secara bebas atau rekombinasi dan migrasi gen dari satu tempat ketempat lain (Suryanto, 2003). Variasi genetik dalam suatu populasi tanaman sangat penting, agar seleksi dengan maksud untuk mendapatkan karakter-karakter unggul dapat dilakukan. Makin besar suatu variasi genetik yang terdapat pada organisme, maka peluang untuk mendapatkan genotipe yang unggul semakin besar pula dan menunjukkan besarnya pengaruh genetik terhadap sifat yang diekspresikan (Pandin, 2010).

Keragaman genetik sangat penting untuk mengetahui besarnya variasi genetik yang berada di dalam dan antar populasi sebaran alamnya (Indrioko, 1996). Keragaman genetik bermanfaat untuk mengetahui asal-usul jenis tanaman tertentu, menentukan strategi pemuliaan tanaman, dan menentukan strategi konservasi genetik.

### **2.3 DNA (*Deoxyribunecleid Acid*)**

Muladno (2002), DNA tersusun oleh tiga komponen, yaitu molekul gula pentosa (*deoxyribose*), gugus fosfat dan basa nitrogen. Gula pentosa dan gugus fosfat bersifat identik sedangkan basa nitrogen mempunyai susunan dan bentuk yang berbeda dalam satu nukleotida dengan nukleotida lain. Noor (2008), terdapat empat macam basa nitrogen yaitu *Adenin*, *Guanin*, *Timin* dan *Sitosin*. Basa adenin dan guanin digolongkan sebagai basa purin, sedangkan basa timin dan sitosin sebagai basa pirimidin. Struktur molekul DNA terdiri atas dua rangkaian nukleotida yang tersusun secara linier. Kedua rangkaian yang saling berikatan terbentuk seperti tali berpilin sehingga molekul DNA dikatakan *double helix* (heliks ganda).

*Deoxyribonucleic Acid* (DNA) merupakan material genetik yang diturunkan dari generasi ke generasi berikutnya. Gen disusun oleh suatu substansi yang disebut dengan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*). DNA bersama-sama protein dan molekul *Ribonucleic Acid* (RNA) terdapat dalam inti sel. Ketiganya saling terkait membentuk kromosom yang merupakan komponen penting semua makhluk hidup (Muladno, 2002).

Thenawijaya (1982) menyatakan, DNA berfungsi untuk menyimpan informasi genetik secara lengkap yang diperlukan untuk mencirikan struktur

semua protein dan RNA tiap-tiap spesies organisme dan menempatkan biosintesis sel dan komponen jaringan secara teratur, untuk menentukan aktivitas organisme sepanjang siklus hidupnya dan untuk menentukan kekhususan organisme tertentu. DNA berperan dengan cara mengendalikan proses pembentukan rantai protein. Protein merupakan salah satu senyawa penting dalam kehidupan organisasi. Protein terdapat diberbagai bentuk seperti enzim, protein pengangkut, protein cadangan antibody dan hormon (Thenawijaya, 1982).

Yusuf (2001) menyatakan, sel DNA berperan dengan cara mengendalikan proses pembentukan rantai protein. Dalam sel eukariot pembentukan protein berlangsung di dalam sitoplasma, sedangkan kromosom terdapat di dalam inti, yang dikelilingi membran inti. Antara DNA kromosom yang ada di dalam anti protein yang dibentuk di dalam sitoplasma diperlukan penghubung dan peranan ini dipenuhi oleh molekul RNA. RNA dapat ditemukan baik di dalam inti maupun sitoplasma. Proses ini berlaku bagi semua organisme, mulai virus, prokariot, dan eukariot.

Informasi genetik yang ada dalam DNA akan ditranskripkan menjadi RNA *messenger* (mRNA) yang ada di dalam inti sel dibantu oleh enzim transkriptase, selanjutnya mRNA akan keluar dari inti sel menuju ke sitoplasma untuk membawa informasi dari DNA tersebut ke ribosom kemudian ditranlasikan sehingga membentuk protein. Protein yang terbentuk sangat dibutuhkan bagi metabolisme organisme untuk perkembangannya dan akan mempengaruhi karakter organisme tersebut. DNA sebagai unit keturunan terkecil, terdapat di semua makhluk hidup mulai dari mikroorganisme sampai organisme tingkat tinggi seperti manusia, hewan dan tanaman, tidak semua DNA memiliki fungsi

genetik dan banyak dari DNA organisme tingkat tinggi yang memiliki DNA non genetik lebih banyak dari pada organisme tingkat rendah. DNA yang terdapat dalam sel berupa DNA mitokondria, DNA kloroplas atau DNA penyusun kromosom, sedangkan DNA yang terdapat dalam inti sel disebut DNA inti. DNA dapat diperoleh atau diekstrak dari berbagai macam organ seperti daging, darah, sperma, ginjal, jantung, hati dan limfa karena sel terdapat disemua organ tersebut (Muladno, 2002).

## **2.4PCR (*Polymeration Chain Reaction*)**

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik yang sangat berguna dalam membuat salinan DNA. PCR memungkinkan sejumlah kecil sekuens DNA tertentu disalin untuk diperbanyak sehingga dapat dianalisis atau dimodifikasi. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Chamberlain dan telah berhasil digunakan dalam berbagai analisis DNA seperti delesi, mutasi, dan polimorfisme (Chamberlain *et al.*, 1988). Finkeldey (2005), menyatakan bahwa PCR adalah suatu metode untuk menggandakan atau mengamplifikasi DNA yang diisolasi pada sebuah tabung reaksi kecil melalui replikasi berulang. Sedangkan menurut Bernard (1998), PCR merupakan suatu teknik untuk memperbanyak potongan DNA yang spesifik.

Optimasi PCR diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan. Suhu *denaturasi* yang rendah dapat menyebabkan belum terbukanya DNA utas ganda sehingga tidak memungkinkan terjadinya polimerisasi DNA baru. Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel



pada sisi lain genom yang bukan sisi homolognya, akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah yang tidak spesifik dalam genom. Suhu penempelan (*annealing*) ditentukan berdasarkan primer yang dipakai, dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer. Suhu *annealing* ini sebaiknya sekitar 5<sup>0</sup>C dibawah suhu leleh (Rybicky, 1996).

Muladno (2002), PCR merupakan suatu reaksi *in-vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target dengan bantuan enzim sebagai primer dalam suatu *thermocycler*. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Primer yang berada sebelum daerah target disebut sebagai *primer forward* dan yang berada setelah target disebut *primer reverse*. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru dikenal sebagai enzim *polymerase*. Agar dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, dengan menggunakan dNTPs yang mencakup dATP (nukleotida berbasis adenin), dCTP (sitosin), dGTP (guanin) dan dTTP (timin).

Lisdiyanti (1997), terdapat beberapa komponen penting dalam reaksi PCR yaitu DNA target, primer, enzim Taq DNA *polymerase*, *deoxynucleoside triphosphat* (dNTP) dan larutan penyangga (*buffer*). Pada PCR, polimerisasi DNA hanya dapat dimulai jika ada primer. Yuwono (2007), menyatakan primer berfungsi untuk mengawali proses polimerisasi untai DNA. Molekul primer dapat berupa molekul DNA atau RNA, atau bahkan protein spesifik. Biasanya, pada PCR primer yang digunakan adalah molekul DNA.

Amplifikasi DNA untuk menyeleksi 5 primer acak yang sesuai dilakukan dengan menggunakan 20 primer acak. volume reaksi PCR adalah 15  $\mu$ l yang terdiri dari 7,5  $\mu$ l *Hot Star Taq Plus Master Mix* (Qiagen), 1,8  $\mu$ l primer (5  $\mu$ M), 1,5  $\mu$ l *coral load* 10x, 2,0  $\mu$ l DNA template dan 2,2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bebas R-Nase. Hasil dari seleksi 20 primer ini, selanjutnya akan dipilih 5 primer yang akan dilanjutkan untuk amplifikasi DNA tumbuhan pasak.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan PCR CFX 9600 (Bio-red). Pengaturan mesin PCR adalah sebagai berikut *pre-denaturation* 95°C selama 5 menit, diikuti 39 siklus yang terdiri *denaturation* pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 37°C selama 1 menit, *extention* pada suhu 72°C selama 1 menit, dan *finalextention* pada suhu 72°C selama 8 menit.

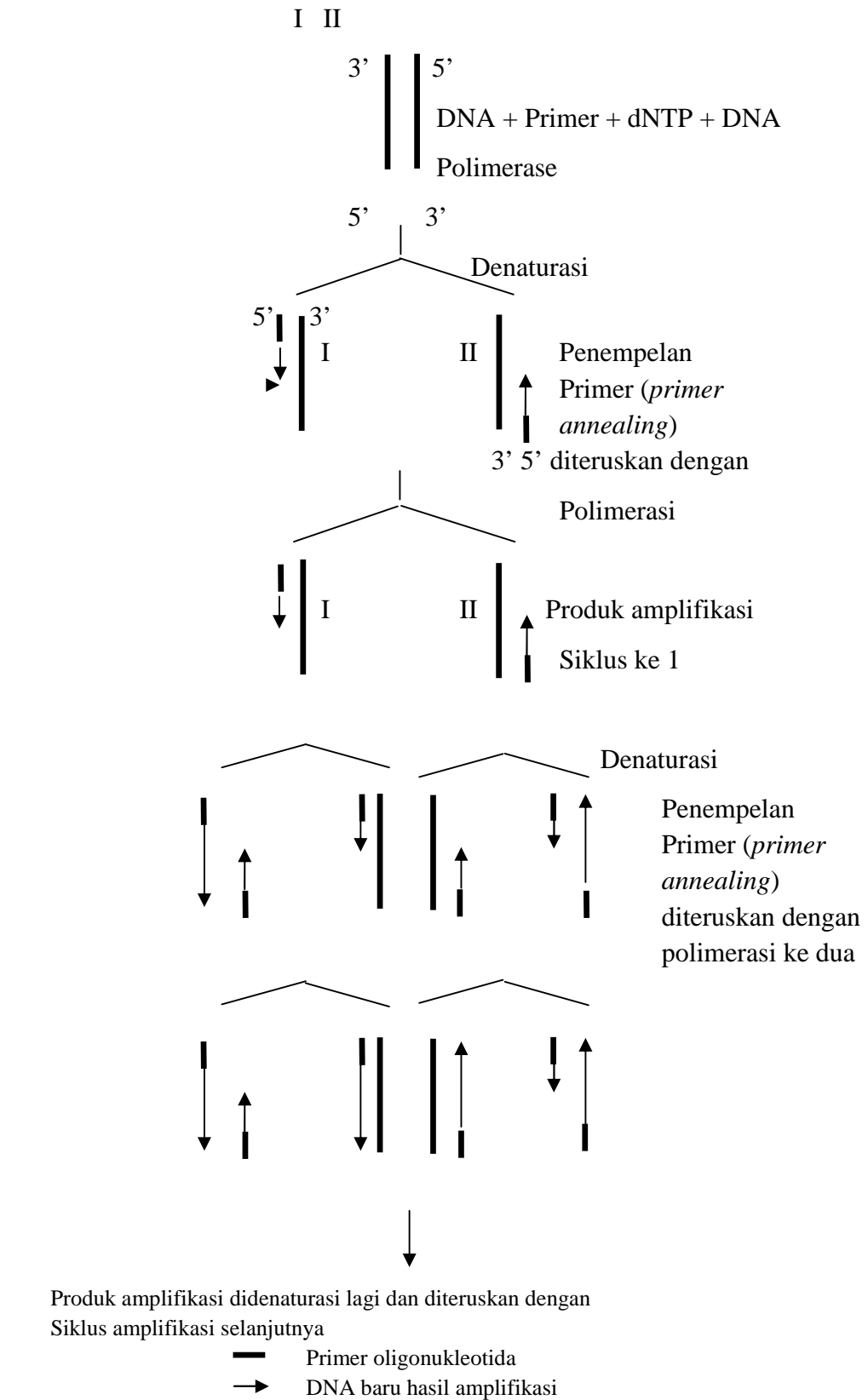
Hasil PCR kemudian dielektroporesis pada gel *agarose* dengan konsentrasi 1% (w/v). Masing-masing sampel (5  $\mu$ l) dimasukkan ke dalam sumur *agarose* dan satu sumur terakhir dimasukkan DNA ladder yang berfungsi sebagai marker. Elektroforesis dilakukan selama  $\pm$  30 menit menggunakan *buffer TAE* 1 $\times$  dengan *voltase* 100 V  $\pm$  30 menit. Setelah elektroforesis dilakukan, gel direndam dalam larutan pewarna (staining) *etidium bromide* (5  $\mu$ l/500 ml air) selama  $\pm$  15 menit, lalu dibilas menggunakan air destilasi selama  $\pm$  25 menit. Setelah itu gel diletakkan di Gel doc (Bio-rad) untuk di dokumentasikan. Deteksi pola pita dilakukan dengan menggunakan *software* pel image versi 2.01.

*Denaturasi* adalah proses pemisahan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal pada suhu tinggi. Suhu denaturasi dibuat sedemikian rupa agar dapat mendenaturasi DNA template secara sempurna tanpa harus menghilangkan aktivitas enzim polymerase. Denaturasi pada siklus PCR memerlukan waktu 15

sampai 60 detik (Innis dan Gelfand, 1996). Selanjutnya Lisdiyanti (1997), menyatakan tidak sempurnanya denaturasi dapat menyebabkan utas DNA terputus-putus dan tahap denaturasi yang terlalu lama mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim polymerase. Waktu yang diperlukan enzim *Taq polymerase* adalah pada kisaran suhu 95<sup>0</sup>C selama 3 menit.

*Annealing* merupakan proses penempelan *primer* pada DNA target dimana besar suhu *annealing* tergantung pada panjang dan jumlah basa G dan C dalam primer dan konsentrasi garam dalam *buffer* (Newton dan Graham, 1994). Menurut Lisdiyanti (1997), suhu *annealing* sangat berguna untuk mencegah timbulnya pita elektroporesis yang tidak spesifik. Sedangkan menurut Wu *et al.*, (1996), menyatakan hubungan empiris antara suhu optimum *annealing* dan panjang normal primer.

*Ekstension* adalah proses perpanjangan primer sejumlah DNA target. Pada tahap *ekstension* (sintesis DNA) enzim polymerase bergabung bersama dengan nukleotida dan pemanjangan primer lengkap untuk mensintesis sebuah DNA utas ganda. Reaksi ini terus berubah dari siklus ke siklus mengikuti pola perubahan konsentrasi DNA.



Gambar 2.4. Skema Amplifikasi DNA dengan Teknik PCR (Yuwono, 2008).

## 2.5 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

*Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) pertama kali diperkenalkan oleh Williams *et al.*, (1990). RAPD merupakan suatu jenis penanda molekuler yang banyak dipakai dalam penelitian dan diagnostik biologi molekuler. Finkeldey (2005), menyatakan bahwa penanda RAPD bersifat dominan, sehingga tidak mungkin mengenali individu heterozigot. Pada tanaman tahunan, RAPD sangat membantu dalam meningkatkan efisiensi pada seleksi awal (Grattapaglia *et al.*, 1992). Penggunaan penanda molekuler sangat bermanfaat untuk membandingkan berbagai karakterisasi setiap organisme hidup baik berdasarkan penanda RAPD ataupun dengan analisis berdasarkan penanda lain seperti RFLP, SSR dan AFLP sehingga data yang diperoleh lebih akurat (Weishing *et al.*, 1995).

RAPD merupakan modifikasi dari teknik PCR yaitu suatu teknik molekuler yang dapat memperbanyak satu atau lebih bagian DNA hingga jutaan kali secara cepat dan tepat. Pola pita DNA dapat dilihat setelah melalui elektroforesis dan disinari di bawah UV. Pola pita tersebut berpeluang berbeda satu sama lainnya, dikarenakan adanya variasi genetik. Dalam teknik RAPD biasanya menggunakan suatu primer yang pendek (9-12 basa) yang mampu mengaplikasikan fragmen-fragmen kromosom secara random (*arbitrary*). Melalui teknik ini akan diperoleh *polymorphism* fragmen-fragmen DNA hasil amplifikasi yang memperlihatkan adanya variasi genetik diantara genotipe yang diuji. Penggunaan *primer* yang berbeda akan memberikan pola pita amplifikasi dan *polymorphism* yang berbeda (Powell *et al.*, 1995).

Tabel 2.1 Perbandingan tahapan kerja antara RAPD, RFLP, AFLP dan SSR

No	Pembanding	RAPD	RFLP	AFLP	SSR
1.	Lokus amplified terdeteksi	Dominan	Kodominan	Kodominan	Kodominan
2.	Prinsip	Amplifikasi DNA, primer acak	Retriksi dengan endonuklease, southernlot, hybridisasi	Retriksi dengan endonuklease, amplifikasi DNA, perlu pasangan primer spesifik dan adaptor	Amplifikasi DNA dan perlu pasangan primer spesifik
3.	Tipe polimorfism terdeteksi	Perubahan basa	Perubahan basa	Perubahan basa	Perbedaan panjang pengulangan basa
4.	Berbasis PCR	Ya	Tidak	Ya	Ya
5.	Kualitas DNA	Tinggi	Tinggi	Sedang	Sedang
6.	Kebutuhan DNA ( $\mu$ g)	0.02	10	0.5-1.0	0.05
7.	Perlu informasi sekuens	Tidak	Tidak	Tidak	Perlu
8.	Metode deteksi radioisotope	Tidak	Ya/tidak	Ya/tidak	Ya/tidak
9.	Reproducible	Rendah	Tinggi	Tinggi	Tinggi
10.	Tingkat kesulitan	Rendah	Sedang	Sedang-Tinggi	Sedang-Tinggi
11.	Kemampuan otomatisasi	Sedang	Rendah	Sedang	Tinggi
12.	Biaya pengembangan	Rendah	Sedang	Tinggi	Tinggi
13.	Biaya per analisis	Rendah	Tinggi	Sedang	Rendah

Sumber : Azrai (2005) dan Pandin (2010)

RAPD memiliki beberapa kelebihan dalam menganalisa variasi genetik dan hubungan kekerabatan suatu tanaman antara lain prosedurnya lebih mudah, murah, cepat dan contoh DNA yang diperlukan hanya sedikit (5-25 ng) dan tidak membutuhkan radioisotope (Sharma *et al.*, 2008). Dalam setiap penanda molekuler memiliki teknik yang berbeda-beda baik dalam jumlah DNA yang diperlukan, dana, waktu, prosedur pelaksanaan, tingkatan polimorfisme serta pengujian secara statistik.

Teknik RAPD juga memiliki beberapa kelemahan, yaitu pemunculan pita-pita DNA sangat sensitif terhadap perubahan kondisi sehingga memberikan hasil yang tidak konsisten (Demeke dan Adam, 1994). Yu dan Pauls (1992), menyatakan bahwa banyak faktor yang mempengaruhi ketidakstabilan dan sensitifitas RAPD seperti rasio template DNA dan primer, konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  dan enzim *Taq-Polymerase* yang digunakan dan jenis mesin PCR yang dipakai, serta rendahnya suhu annealing dan pendeknya primer RAPD yang digunakan. Pemanfaatan teknologi molekuler berbasis RAPD ini banyak membantu sehingga RAPD layak digunakan dalam suatu analisis yang bermanfaat dalam upaya pemuliaan tanaman, genetika populasi dan studi biodiversitas (Rafalski *et al.*, 1991).